Estudos sobre imunidade na peste

pelo

DR. ARTHUR MOSES

Assistente.

Studien ueber Immunitaet bei der Pest

von

DR. ARTHUR MOSES

Assistenten am Institute.

Encarregados do preparo do soro antipestoso no Instituto, ocorreu-nos verificar uma questão, que ha muito se debate, qual a da secreção de toxina por parte do bacilo da peste.

Em balões de FERNBACH, com caldo simples lijeiramente alcalino ou neutro semeiámos bacilo da peste cuja virulencia se mantem em inoculações quinzenais em cobaia ou rato e mantivemol-os durante 30 a 45 dias em temperatura ambiente ou na estufa a 35 ou 37 gráos. Em prazos diversos 1, 3, 8, 14, 20, 30 e 45 dias filtrámos em papel CHARDIN e em velas BERKEFELD e CHAMBERLAND F, pequenas quantidades da cultura e inoculámos por via venosa em rato. Quando filtradas em papel, os animais inoculados morriam em prazo variavel, revelando a necropse bacilos da peste no ponto inoculado; quando em vela, não só resistiam os animais, mas ainda, não se mostravam imunes a posterior inoculação de germe vivo. MARKL, (1898) en-

Der Umstand, dass ich im hiesigen Institute mit der Herstellung des Pestserums beauftragt bin, veranlasste mich zum Studium einer viel debattierten Frage, naemlich der Sekretion von Toxinen durch den Pestbazillus.

Ich nahm FERNBACHsche Ballons mit einfacher neutraler oder schwach alkalischer Bouillon und impfte sie mit Pestbazillen, deren Virulenz durch zweiwoechentliche Passagen durch Meerschweinchen oder Ratten unterhalten wird; die Kulturen blieben 30-45 Tage bei Zimmertemperatur oder in einem Bruetschrank von 35-37°. Jeweilen nach 1, 3, 8, 14, 20 30 und 45 Tagen wurden kleine Quantitaeten der Kultur durch CHARDINsche Papierfilter oder Filterkerzen (BERKEFELD und CHAMBERLAND F) filtriert und Ratten intravenoes injiziert. Bei Papierfiltration starben die geimpften Tiere nach wechselnder Frist und zeigten bei der Sektion am Orte der Impfung Pestbazillen; bei Anwendung

tretanto, consegue matar ratos, em 24 horas, com 0,05 cc. de filtrado de cultura de quatro semanas e em 48 horas, com 0,005 cc. de cultura de 48 horas. Aquecido a 70 gráos, perde o filtrado a toxidez para camondongo, mantendo-a para rato, cobaia e coelho. A produção de antitoxina em animais inoculados com toxina aquecida fez o autor acreditar na existencia de 2 toxinas no filtrado.

Em outro ensaio, inoculámos em rato de peso aproximado de 100 gr. filtrado em vela CHAMBERLAND de culturas de um mez, em meio preparado, adicionando a 500 cc. de caldo neutro ou alcalino 150 de soro de cavalo, aquecido a 56 gráos, mantendo um dos balões de FERNBACH no armario do laboratorio e outro em estufa a 37 gráos. Dos ratos inoculados, morreu um em 2 dias com forte edema hemorajico no ponto de inoculação.

A ausencia de germes no edema fez-nos pensar em ação especifica do filtrado, hipotese esta afastada após inoculação de doses decrecentes, desde 2cc. até 0,1cc. do mesmo material em nova serie de ratos, que se mantiveram todos vivos.

De posse destes resultados, semeiámos outros balões de FERNBACH, contendo caldo neutro e quantidades variaveis de carbonato de sodio cristalisado, 1—2—3—4 grs. por litro. O conteúdo de cada um destes balões filtrado após vinte dias, um mez ou quarenta dias de permanencia em temperatura ambiente e inoculado cerca de 1 cc. em ratos de 100 grs de peso, por via subcutanea, mostrou-nos que, ainda desta vez, não tinhamos conseguido toxina pestosa livre no caldo.

Em outra serie, adicionámos ao caldo neutro doses crecentes de sulfato de sodio, desde 1 até 10 grs. por litro, mantendo os balões em temperatura ambiente e na estufa a 37 gráos. Ainda desta vez, as inoculações em ratos foram por via subcutanea. Dos inoculados com o filtrado de cultura, contendo 6 a 8 grs por litro, morreram alguns, 3 a 5 dias depois, sem que da necropse se pudesse tirar conclusão. Repetidas inoculações com doses decrecentes deste material provaram-nos não exis-

von Kerzen blieben die Tiere nicht nur am Leben, sondern zeigten auch gegen eine spaetere Impfung mit lebenden Bazillen keine Immunitaet. Dagegen konnte MARKL [1898] Ratten binnen 24 Stunden mit 0,05 Kzm. und binnen 48 Stunden mit 0,005 Kzm. Filtrat einer vier Wochen alten Kultur toeten. Auf 70° erhitzt verlor das Filtrat die Giftigkeit fuer Maeuse, waehrend eine solche fuer Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen fortbestand. Die Bildung von Antitoxin bei den mit Toxin geimpften Tieren liess den Autor die Existenz zweier Toxine im Filtrat annehmen.

Bei einem anderen Versuche impfte ich eine za. 100 Gramm schwere Ratte mit durch CHAMBERLANDsche Kerzen filtrierten, einen Monat alten Kulturen; das Naehrmedium bestand aus 500 Kzm. neutraler oder leicht alkalischer Bouillon mit 150 Pferdeserum, wobei ein Ballon im Laboratoriumsschranke, ein anderer bei 37° aufbewahrt wurde. Von den geimpften Ratten starb eine nach zwei Tagen mit starkem haemorrhagischem Oedem der Impfstelle.

Das Fehlen von Keimen an der Impfstelle liess mich an eine spezifische Wirkung des Filtrates glauben; indessen wurde diese Annahme durch eine neue Versuchsreihe widerlegt, bei welcher absteigende Dosen von 2,0—0,1 Kzm. auf Ratten uebertragen wurden, welche alle am Leben blieben.

Im Besitze dieser Resultate impfte ich neue Ballons, welche neutrale Bouillon mit wechselnden Mengen krystallisierten Natriumkarbonates (1,2,3 und 4 Gramm pro Liter) enthielten. Nach einem Wachstum von 20,30 oder 40 Tagen bei Zimmertemperatur wurde der Inhalt dieser Ballons filtriert; eine subkutane Verimpfung von je 1 Kzm. auf Ratten von 100 Gramm Gewicht, zeigte mir dass auch dieses Mal die Bouillon kein freies Toxin enthielt.

Iei einer weiteren Serie setzte ich zu der neutralen Bouillon steigende Dosen von Natriumsulfat (1,0—10,0 gr. pro Liter) und liess die Ballons bei Zimmertemperatur und im Bruetschrank bei 37° stehen. Auch diesmal war die Verimpfung subkutan. Von den Tieren,

tir no filtrado toxina, que com regularidade matasse ratos ou camondongos.

Nem outro foi o resultado obtido, inoculando filtrado de cultura de 40 dias em temperatura ambiente, em caldo neutro, contendo 10 grs. de glicose e 1—2—4—6—8—10 e 20 grs. de sulfato de sodio por litro. Ainda desta vez, com o filtrado dos balões contendo 6, 8 e 20 grs de sulfato morreram poucos dos ratos inoculados, sem que de posteriores experiencias pudessemos concluir que existisse em alguma das culturas toxina pestosa, matando, com regularidade, animais sensiveis. Depois de procurar, com resultado negativo, obter toxina em cultura em caldo soro, contendo 4 e 8 grs. de sulfato de sodio por litro, em caldo neutro com 50 grs de glicose por litro e 5 a 10 grs. de sulfato de sodio, em caldo soro com 5 grs. de glicose e, finalmente, em caldo soro com 1 a 3 grs. de carbonato de sodio cristalisado por litro, usando sempre manter a cultura em balão de FERNBACH, durante um mez em temperatura ambiente, passámos a estudar a possibilidade de conseguir uma endotoxina de atividade bastante para dela se poder tirar vantajem no preparo de um soro. Quer toxina livre, quer endotoxina poderiam explicar a forte prostração e propensão para hemorajias, que se rejistam na peste. Das endotoxinas obtidas por pesquisadores diversos, algumas se extraem do bacilo em quantidade diminuta e para elas não se tem conseguido formação de anticorpo com poder neutralisante, ao passo que outras se obtem em quantidade maior e para elas se tem conseguido imunisoro. BESREDKA extrae de culturas em gelatina emulsionadas em solução fisiolojica aquecida a 60 gráos, durante uma hora, uma endotoxina soluvel para o qual produz antiendotoxina. BESREDKA recomenda ainda secar no vacuo a emulsão e depois tratar 0,15 grs de germe por 2 cc. de solução fisiolojica e 8 cc. de soro. Após uma e meia a duas horas de permanencia em temperatura de labaratorio centrifuga-se e no liquido se encontra endotoxina capaz de produzir antiendotoxina. LUSTIG e GALLEOTI (1897) empregam solução

die 6,0-8,0 enthaltendes Kulturfiltrat erhielten, starben einige 3—5 Tage spaeter, ohne dass die Autopsie zu einem Schlusse fuehrte. Wiederholte Uebertragung dieses Materiales in absteigenden Dosen ueberzeugte mich, dass das Filtrat kein Toxin enthaelt, welches Ratten oder Maeuse regelmaessig toetet.

Nicht anders war das Resultat beim verimpfen filtrierter Kulturen, die 40 Tage bei Zimmertemperatur gestanden hatten und auf einen Liter neutrale Bouillon mit 10 Gramm Glykose 1,2,4,6,8,10 und 20 Gramm Natriumsulfat enthielten. Auch dieses Mal starb nur ein geringer Teil der mit den 6,8 und 20 Gramm Natriumsulfat enthaltenden Filtraten geimpften Ratten, ohne dass spaetere Versuche gestattet haetten, anzunehmen, dass in den Kulturen ein fuer empfindliche Tiere regelmaessig toedliches Toxin existiere. Nachdem ich umsonst versucht hatte, Toxin zu erhalten, indem ich Serumbouillon mit 0,4 und 0,8% Natriumsulfat, neutrale Bouillon mit 5% Glykose und 0,5—1% Natriumsulfat, Serum bouillon mit 0,5% Glykose und zuletzt Serumbouillon mit 0,1—0,3%0 krystallisierten Natriumkarbonates gebrauchte und die Ballonkulturen einen Monat lang bei Zimmertemperatur hielt, untersuchte ich, ob es moeglich waere, ein genuegend aktives Endotoxin zu gewinnen, um dasselbe bei der Herstellung eines Serums mit Erfolg zu gebrauchen. Die starke Prostration und Neigung zu Haemorrhagien, welche bei der Pest beobachtet wird, liess sich ebensowohl durch ein Endotoxin, als durch ein freies Toxin erklaeren. Von den durch verschiedene Untersucher gewonnenen Endotoxinen, koennen einige nur in geringen Quantitaeten den Bazillen entzogen werden und es wurde fuer dieselben kein Antikoerper mit neutralisierender Wirkung erzielt, waehrend fuer andere, welche in groesserer Menge erhaeltlich sind, ein Immunserum gewonnen wurde. Aus Gelatinekulturen, die in physiologischer Kochsalzloesung suspendiert und eine Stunde lang auf 60° erhitzt wurden, extrahierte BESREDKA ein loesliches Endotoxin, fuer welchas er ein Antiendotoxin herstellte. Er empfiehlt

de potassa a 0,75% até 1% para extrair de uma cultura de 24 horas sobre a qual atua durante 12 a 24 horas e tratamento posterior pelo acido acetico do filtrado em papel, uma nucleoproteina com capacidade imunisante para o homem na dóse de 2 a 3 mg. e de 1,1 para cada 100 grs. de ratos. A mais importante propriedade das nucleoproteinas no ponto de vista biolojico e pratico é, justamente a capacidade, que têm de funcionar como substancia imunisante ativa. ROWLAND (1911), da comissão ingleza para estudo da peste na India, propoz para extrair do bacilo da peste uma nucleoproteina com propriedade de antijeno a seguinte tecnica—: Culturas de quatro dias em temperatura de 30 gráos são mortas pelo cloroformio e dos germes mortos se extrae com solução fisiolojica uma substancia de pouco valor toxico e nenhum valor imunisante e com sulfato de sodio, outra, B, bastante toxica, que, inoculada em ratos em dose submortal imunisa-os contra posterior inoculação de germe vivo. As propriedades quimicas das 2 substancias muito se aproximam. Posteriormente ROWLAND destruiu os germes pelo calor, colocando o frasco de cultura na estufa a 60 gráos pelo espaço de uma hora. A relação entre a nucleoproteina obtida e a quantidade de germes na cultura, feitas as verificações por pesada, é de 1:10. Mais ativa que o produto de LUSTIG e GALLEOTI e de mais facil preparo imunisa 60% dos ratos com a inoculação de 0,0001 mg. Quando guardada, perde rapidamente a toxidez. Mais tarde, recomendou como mais constante produto o que denomina TRK e que não é mais que uma mistura de bacilos mortos e sulfato de sodio, preparada na temperatura de 37 gráos e rapidamente solidificada em cuba com gelo e conservada em fragmentos, em vidro com rolha de esmeril. Na ocasião de se usar disolve-se um fragmento em solução salina a 0,85% na temperatura de 36 gráos, resfria-se até O grão, para então filtrar.

O aquecimento a 53 ou 60 gráos pelo espaço de meia hora reduz a toxidez, respetivamente, a um quarto ou a um nono.

auch, die Emulsion im Vacuum zu trocknen und auf 0,15 Bakteriensubstanz 2,0 physiologische Loesung und 8,0 Serum einwirken zu lassen. Nach 1 1/2—2stuendiger Einwirkung bei Laboratoriumstemperatur findet man in der Fluessigkeit ein Endotoxin, mit dem man ein Antiendotoxin gewinnen kann. LUSTIG und GALEOTTI (1897) gebrauchten eine 0,75—1 % ige Kaliloesung, welche 12—24 Stunden auf eine 24stuendige Kultur einwirkte, dann durch Papier filtriert und mit Essigsaeure behandelt wurde, um ein Nukleoprotein zu extrahiren, welches beim Menschen in der Dose von 2—3 Mg., bei der Ratte in derjenigen von 1,1, fuer je 100 Gramm Gewicht, immunisierend wirkte. Die biologisch und praktisch wichtigste Eigenschaft der Nukleoproteine ist gerade ihre Faehigkeit als aktiv immunisierende Substanz zu funktionieren. ROWLAND, ein Mitglied der englischen Kommission fuer das Studium der Pest in Indien, proponierte 1911 die nachfolgende Tecknik, um aus den Pestbazillen das Nukleoprotein mit Antigeneigenschaften zu gewinnen: Kulturen, welche vier Tage bei 30° gewachsen waren, werden mit Chloroform getoetet; aus den toten Bazillen entzieht man mit physiologischer Loesung eine wenig toxische und gar nicht immunisierende Substanz (A) und mit Natriumsulfat eine andere (B), welche ziemlich toxisch ist und Ratten, die eine, nicht ganz toedliche Dose erhalten hatten gegen eine spaetere Anwendung lebender Bazillen schuetzt. Spaeter toetete ROWLAND die Keime durch Hitze, indem er die Kulturflaschen fuer eine Stunde in einem Bruetschrank bei 60° hielt. Das Verhaeltnis zwischen dem erhaltenen Nukleoprotein und der Bakterienmasse in der Kultur wurde durch Waegung auf 1:10 bestimmt. Das Produkt ist wirksamer und leichter herzustellen, als dasjenige von LUSTIG und GALEOTTI; mit 0,001 Mg. kann man 60 % der Ratten immunisieren. Beim Aufbewahren verliert sich die Giftigkeit rasch. Als haltbarer empfahl der Autor spaeter ein Produkt, welches er TRK nannte und welches aus einer Mischung von Natriumsulfat und abgetoeteten Bazillen besteht, welche er bei

De culturas de 48 horas em agar emulsionadas em solução fisiolojica e mortas pelo calor, cloroformio ou toluol, procurámos obter uma substancia toxica, que se libertasse do bacilo e, inoculando os germes mortos em ratos e cobaias verificámos que a inoculação de germes aquecidos a 65 gráos, durante uma hora não é mortal, concordando este resultado com o da comissão alemã pare estudo da peste. Cerca de 30 % dos ratos inoculados com bacilos mortos pelo cloroformio morriam 4 a 5 dias depois.

A tecnica de LUSTIG e GALLEOTI, repetida, permitiu-nos obter um produto toxico, que, embora mortal para ratos de 100 grs. de peso, quando inoculado com 1, 3 —1, 5 e 2mgs., não o era para todos os ratos inoculados e imunizava cerca de 40 % deles, quando inoculados com dose submortal, como seja 0,8mgs.

Nos ensaios para extração da nucleoproteina de ROWLAND [1912] preferimos destruir pelo cloroformio os germes que, contrario ao que escreve este autor, assim nos forneceram produto de toxidez mais elevada que o extraido do bacilo pelo calor, porque a temperatura necessaria de 60 gráos diminuia o poder toxico da nucleoproteina. MARKL [1898] já tinha verificado que bacilo da peste morto pelo cloroformio tem poder toxico mais elevado do que, quando morto pelo calor.

O cloroformio dá logar á formação de um produto atoxico instavel e reversivel, que de novo adquire a toxidez, quando tratado pelo sulfato de sodio. A ação toxica da nucleoproteina assim obtida diminue rapidamente. Procurámos evitar este incoveniente, secando o produto, sem que assim obtivessemos resultado mais favoravel. Notámos ainda que a toxidez da nucleoproteina se prende á virulencia do germe, assim é, que durante o correr do trabalho e por motivo

einer Temperatur von 37 herstellt, in einem Gefaesse mit Eis rasch erstarren laesst und stueckweise in Glaesern mit Glasstoepseln aufbewahrt. Zum Gebrauche wird ein Stueck in 0,85 % Salzloesung bei 36° aufgeloest, auf 0° abgekuehlt und dann filtriert.

Eine halbstuendige Erhitzung auf 55 oder 60° reduziert die Giftigkeit auf 1/4, resp. 1/9.

Aus 48stuendigen, in physiologischer Loesung suspendierten und durch Hitze, Chloroform oder Toluol abgetoeteten Kulturen, versuchte ich eine toxische. Substanz zu gewinnen, welche aus den Bazillen ausgezogen koennte; bei Verimpfung der toten Keime auf Ratten und Meerschweinchen, konstatierte ich, dass auf 65° erhitzte Bazillen nicht toetlich wirken, was mit den Resultaten der deutschen Kommission zum Studium der Pest uebereinstimmt. Von den Ratten, denen mit Chloroform abgetoetete Bazillen einverleibt wurden, starben 30 % 4—5 Tage darauf.

Durch Wiederholung der Technik von LUSTIG und GALEOTTI gelang es mir ein toxisches Produkt zu erhalten, welches in Dosen von 1, 0—1, 5 oder 2 Mgr. fuer Ratten von 100 Gramm Gewicht zwar toedlich war, aber nicht immer, waehrend es in submortaler Dose (z. B. 0,8 Mgr.) verimpft, 40 % derselben immunisierte.

Bei den Versuchen, das Nukleoprotein von ROWLAND zu isolieren, zog ich es vor, die Keime durch Chloroform zu toeten, da sie mir so—im Gegensatz zu den Angaben des Autors—ein giftigeres Produkt lieferten, als die durch Hitze abgetoeteten Bazillen, weil die noetige Temperatur (60°) die Toxizitaet des Nukleoproteins herabsetzte. MARKL stellte schon 1898 fest, dass durch Chloroform getoetete Bazillen hoehere Giftigkeit besitzen, als durch Hitze abgetoetete.

Das Chloroform fuehrt zur Bildung eines atoxischen und reversibeln Produktes, welches bei Behandlung mit Natriumsulfat wieder giftig wird. Die Wirksamkeit des so erhaltenen Nukleoprotein mimmt rasch ab; ein Versuch diesem Uebelstande durch Trocknen abzuhelfen, ergab mir kein besseres Resultat. Ich beobachtete auch, dass die Giftigkeit des Nukleoproteins von der Virulenz der Keime abhaengt; so ergab sich, als der Stamm, mit dem ich gewoehnlich arbeitete, waehrend dieser Studien (aus Gruenden,

independente de nossa vontade o escantilhão de bacilo, com que habitualmente trabalhavamos, deixou de ser inoculado em rato, durante dous mezes, a nucleoproteina, então extraida, só matava o animal no prazo estabelecido de 48 horas em dóse muito mais alta, que a habitualmente exijida. Com as sucessivas passajens em ratos, restabeleceu-se a dose minima mortal, antes verificada.

Damos em seguida alguns ensaios realizados para avaliar do valor toxico e imunisante do produto de ROWLAND.

Bacilo da peste inoculado de 15 em 15 dias em rato, destruição pelo cloroformio e extração pelo sulfato de sodio.

0,05 mg.	vivo
0,1 mg.	+ 24 h.
0,2 mg.	+ 24 h.
0,3 mg.	+ 48 h.
0,4 mg.	+ 24 h.
0,5 mg.	+ 24 h.
0,6 mg.	+ 48 h.
0,8 mg.	+ 48 h.
1 mg..	vivo.

Em todos os ensaios os ratos inoculados tinham peso que ocilava entre 95 e 105 gs. e os resultados foram verificados após 48 horas.

Na serie acima a dose minima mortal para rato do peso indicado é de 0,1 mg. O fato de se manter vivo o rato inoculado com 10 doses minimas mortais, explicado pela menor sensibilidade ou maior resistencia do animal ao virus reproduziu-se com relativa frequencia nas diversas series que inoculámos no correr dos trabalhos.

Nem sempre era esta a dóse minima mortal verificada, assim é, que em outra serie realizada em identicas condições a nucleoproteina matava animais com dose muito menor:

0,1 mg.	+ 48 h.
0,05 mg.	+ 72 h.
0,04 mg.	+ 24 h.
0,03 mg.	+ 24 h.
0,02 mg.	vivo.
0,01 mg.	vivo.

die nicht von mir abhingen) zwei Monate lang nicht weiter auf Ratten verimpft wurde, dass nun das gewonnene Nukleoprotein erst nach 48 Stunden und in hoeherer, als der gewoehnlichen Dose toedlich wirkte. Doch beobachtete ich nach einigen Passagen durch Ratten wieder dieselbe toedliche Minimaldose.

Nachstehend fuehre ich einige Versuche an, welche zur Feststellung der toxischen und immunisierenden Wirkung des ROWLANDschen Produktes angestellt wurden.

Pestbazillen aus 14taegigen Rattenpassagen, mit Chloroform getoetet und mit Natriumsulfat extrahiert.

Verimpfte Dosis	Resultat
0,05 mgr.	bleibt am Leben
0,1 «	+ binnen 24 St.
0,2 «	+ « 24 «
0,3 «	+ « 48 «
0,4 «	+ « 24 «
0,5 «	+ « 24 «
0,6 «	+ « 48 «
0,8 «	+ « 48 «
1,0 «	bleibt am Leben.

Bei allen Versuchen schwankte das Gewicht der Ratten zwischen 95 und 105 Gramm und das Resultat wurde nach 48 Stunden kontrolliert. In obiger Serie war die kleinste toedliche Dose fuer Ratten von dem angegebenen Gewichte 0,1 Mgr. Die Beobachtung, dass die, mit der zehnfach toetlichen Dosis geimpfte Ratte am Leben blieb, erklaert sich aus einer geringeren Sensibilitaet oder groesseren Resistenz gegen das Virus und wiederholte sich relativ haeufig bei den verschiedenen Serien, die ich im Verlaufe meiner Studien impfte.

Dies war auch nicht immer die niedrigste toedliche Dose, die beobachtet wurde; so toetete bei einer anderen, unter denselben Bedingungen beobachteten Serie das Nukleoprotein die Tiere in weit geringerer Dose:

0,1 Mgr.	+ 48 «
0,05 «	+ 72 «
0,04 «	+ 24 «
0,03 «	+ 24 «
0,02 «	bleibt am Leben
0,01 «	bleibt am Leben

Não só, com raridade se reproduziu este fato, mas ainda, em outra serie em que em nada modificámos as condições da experiencia a dose minima mortal foi de 0,3 mg.

0,1 mg.	vivo.
0,2 mg.	vivo.
0,3 mg.	+ 48 h.
0,4 mg.	+ 72 h.
0,5 mg.	+ 48 h.
0,6 mg.	+ 48 h.

Donde se depreende a dificuldade de obter um produto de valor toxico constante. Entretanto, empregando a mesma tecnica e o mesmo germe, os resultados mais constantes se obtinham com 0,1 mg. Se, com o mesmo germe faziamos a simples extração pela solução fisiolojica, a D. M. M. era de 0,7 mg.

1 mg.	+ 48 h.
0,8 mg.	+ 48 h.
0,7 mg.	+ 48 h.
0,6 mg.	vivo.
0,5 mg.	vivo.
0,4 mg.	vivo.
0,3 mg.	vivo.
0,2 mg.	vivo.
0,1 mg.	vivo.

Donde se conclue a necessidade de empregar 7 vezes a D. M. M., verificada para o produto extraido pelo sulfato de sodio.

Em outros ensaios, empregámos um bacilo cuja virulencia é mantida em inoculações quinzenais em cobaias. Deste germe, que de ha muito não se inocula em rato, extraimos um produto, que em alguns ensaios matava ratos na dose de 0,2 mg. e em outros exijia 0,3, 0,4 e 0,5 mg.

1 mg.	+ 24 h.
0,8 mg.	+ 24 h.
0,6 mg.	+ 48 h.
0,4 mg.	+ 48 h.
0,2 mg.	+ 48 h.
0,1 mg.	vivo.

Se, do mesmo germe fizermos simplesmente a extração pela solução fisiolojica obteremos o seguinte resultado:

Nicht nur wiederholte sich dieses Faktum in seltenen Faellen, sondern es wurde sogar in einer anderen Reihe unter unveraenderten Bedingungen eine Minimaldose von 0,3 Mgr. beobachtet:

0,1 Mgr.	bleibt am Leben		
0,2 «	bleibt am Leben		
0,3 «	+ binnen	48	St.
0,4 «	+ «	72	«
0,5 «	+ «	48	«
0,6 «	+ «	48	«

Man ersieht hieraus die Schwierigkeit, ein Produkt mit einem konstanten Toxizitaetswert zu gewinnen. Doch erhielt ich bei Anwendung derselben Technik und desselben Stammes die konstantesten Resultate mit 0,1 Mgr. Wenn ich dieselben Bazillen mit physiologischer Kochsalzloesung auszog, so war die kleinste toetliche Dose 0,7 Mgr.

1 Mgr.	+ binnen	48	St.
0,8 «	+ «	48	«
0,7 «	+ «	48	«
0,6 «	bleibt am Leben		
0,5 «	bleibt am Leben		
0,4 «	bleibt am Leben		
0,3 «	bleibt am Leben		
0,2 «	bleibt am Leben		
0,1 «	bleibt am Leben		

Man ersieht daraus die Notwendigkeit das Siebenfache der fuer das mit Natriumsulfat gemachte Extrakt bestimmten toetlichen Minimaldosis anzuwenden.

Zu anderen Versuchen gebrauchte ich einen Stamm, dessen Virulenz durch zweiwoechentliche Meerschweinchenpassagen erhalten wurde. Von diesem seit langem nicht mehr auf Ratten verimpften Stamme gewann ich ein Produkt, welches bei einigen Versuchen Ratten in der Dose von 0,2 Mgr. toetete, waehrend andere Male 0,3 0,4 und 0,5 Mgr. noetig waren.

1 Mgr.	+ binnen	24	St.
0,8 «	+ «	24	«
0,6 «	+ «	48	«
0,4 «	+ «	48	«
0,2 «	+ «	48	«
0,1 «	bleibt am Leben		

Machte ich von denselben Keimen einen Auszug blos mit physiologischer Loesung, so erhielt ich das folgende Resultat:

1 mg.	+ 48 h.
0,8 mg.	+ 48 h.
0,6 mg.	vivo.
0,4 mg.	vivo.
0,2 mg.	vivo.
0,1 mg.	vivo.

Entretanto, tão irregulares foram os resultados obtidos em diversas series que não chegámos a firmar qual a D. M. M.

De outro bacilo da peste avirulento e que durante anos não é inoculado em animal de laboratorio, não conseguimos extrair produto toxico algum com solução fisiolojica e, pelo sulfato de sodio obtivemos uma substancia mortal para rato na dose de 1,5 mg. inoculado por via peritoneal e de 1 mg., por via subcutanea.

Depois de ensair o valor toxico da endotoxina procurámos estudar o valor imunisante. O animal de escolha foi ainda o rato do peso anteriormente mencionado. A quantidade inoculada foi de 0,05, 0,03 e 0,01 mg. Quatro dias depois, os animais recebiam, por via subcutanea, pequena dose de germe vivo. Nos animais assim tratados, a mortalidade, que era de 100 % entre os testemunhos, passou a ser de 48 %.

Terminada esta parte, estudámos comparativamente o soro obtido por inoculações subcutaneas e intravenosas de 500 mg. da nucleoproteina de ROWLAND em cavalo, que reajia com elevação de temperatura e perda de peso e o soro antipestoso de Manguinhos obtido por inoculações crecentes de bacilos mortos e vivos.

A primeira tentativa para obtenção de soro antipestoso antitoxico devemol-a a MARKL que em 1898, 1901 e 1903 conseguiu antitoxina para toxina de filtrado de cultura antiga.

Segue-se a ele, DEAN que em 1902 inoculou em cavalo, filtrado de cultura de 10 mezes, obtendo um soro, de que 1 cc. neutralisava 150 a 450 D. M. M.

Entre os soros antiendotoxicos destacam-se os de LUSTIG e GALLEOTI que inoculou 97 grs. de sua nucleoproteina, obtendo um soro com propriedades curativas e pre-

1	Mgr.	+ binnen 24 St.
0,8	«	+ « 24 «
0,6	«	bleibt am Leben
0,4	«	bleibt am Leben
0,2	«	bleibt am Leben
0,1	«	bleibt am Leben

Doch waren die bei verschiedenen Serien erhaltenen Resultate so unregelmaessig, dass ich die kleinste toetliche Dose nicht feststellen konnte.

Bei einem andern avirulenten Peststamme, der Jahre lang nicht auf Tiere verimpft wurde, gelang es mir nicht mit physiologischer Loesung irgend ein toxisches Produkt zu extrahiren, waehrend ich mit Natriumsulfat eine Substanz erhielt, welche fuer die Ratte toetlich war, wenn intraperitoneal 1,5 Mgr. oder subkutan 1 Mgr. verimpft wurde.

Nachdem ich den toxischen Wert des Endotoxines geprueft hatte, versuchte ich seinen immunisierenden Wert su studieren, wobei auch Ratten von dem oben erwaehnten Gewichte gewaehlt wurden. Die verimpften Dosen waren 0,05–0,03 und 0,01 Mgr. Vier Tage spaeter erhielten die Tiere subkutan eine kleine Quantitaet lebender Bazillen. Bei so vorbereiteten Tieren betrug die Mortalitaet 48 % gegen 100 bei Kontrolltieren.

Nach Beendigung dieser Untersuchung machte ich ein vergleichendes Studium mit dem Serum eines Pferdes, welches in subkutanen und intravenoesen Einspritzungen 500 Mgr. des ROWLANDschen Nukleoproteins erhalten hatte, worauf es mit erhoehter Temperatur und Gewichtsverlust reagierte, und dem antipestoesen Serum von Manguinhos, welches durch steigende Injektionen toter und lebender Bazillen erhalten wurde.

Den ersten Versuch zur Herstellung eines antitoxischen Pestserums verdanken wir MARKL, der 1898, 1901 und 1903 fuer das Toxin des Filtrates alter Kulturen ein Antitoxin erzielte.

Auf ihn folgt DEAN, der 1902 ein Pferd mit dem Filtrat einer 10monatlichen Kultur impfte und ein Serum erhielt, von dem 1 Mgr. 150–450 toetliche Mininaldosen neutralisierte.

Unter den antiendotoxischen Serumsorten zeichnen sich die von LUSTIG und GA-

ventivas e o de ROWCAND de que 0,1 e 0,04 cc. tem ação protetora sobre animais posteriormente inoculados com 3 D. M. M.

Estabelecido da media de ensaios que se pode aceitar a quantidade de 0,1 mg. de nucleoproteina extraido de bacilo habitualmente inoculado em rato, misturámos 3 D, M, M. e quantidades variaveis dos dois soros, deixando a mistura em banho maria a 37 gráos durante meia hora, para depois inocular por via subcutanea. Rejistámos assim o seguinte resultado:

Nucl.	Soro de cavalo inoculado com nucleoproteina.	Ratos
0,3 mg.	1 cc.	vivo
« «	0,75	vivo
« «	0,5	vivo
« «	0,25	vivo
« «	0,1	+ 24 h.
—	0,5	vivo
0,1 mg.	—	+ 24 h.

Nucl. Prot.	Soro antipestoso Manguinhos	Ratos
0,3 mg.	1 cc.	+ 6 dias
« «	0,75	+ 13 «
« «	0,5	+ 11 «
« «	0,25	+ 12 «
« «	0,1	+ 6 «
—	0,5	vivo. «
0,1 mg.	—	+ 48 h.

Admitido o prazo de 48 horas para verificação dos resultados, teremos que animal algum dos inoculados com soro antibateriano morreu neste espaço de tempo. Em data posterior, morreram todos. Mesmo nos animais inoculados com soro antiendotoxicos, é comum sobrevir posteriormente a morte.

Se diminuirmos a quantidade de nucleoproteina para uma unica D. M. M., melhor será o resultado obtido com o soro antibateriano:

Nucl. Prot.	Soro antipestoso Manguinhos	Ratos
0,1 mg	1 cc.	vivo
« «	0,75	vivo
« «	0,5	+ 48 h.

LEOTTI und die von ROWLAND aus; erst re verimpften 96 Gramme ihres Nukleoproteins und erhielten ein Serum mit Schutz und Heilwirkung; das Serum des letzteren schuetzte in Dosen von 0,1 und 0,4 Kzm. Tiere, welche nachher mit dem Dreifachen der minimalen toetlichen Dosis geimpft wurden.

Nachdem aus dem Durchschnitte der Versuche die Dose von 0,1 Mgr. des Nukleoproteins (aus den Stamme mit regelmaessigen Rattenpassagen extrahiert) festgestellt war, mischte ich drei minimale toetliche Dosen mit verschiedenem Mengen der beiden Sera, um die Mischung nach halbstuendigem Aufenthalte im Marienbade von 37° subkutan zu verimpfen. Dabei erhielt ich folgendes Resultat:

Nucleoprotein	Sernm des mit Nucleoprotein immunnis. Pferdes	
0,3 Mgr.	1 Kzm.	Bleibt am Leben
«	0,75	«
«	0,5	«
«	0,25	«
«	0,1	+ binnen 24 St.
—	0,5	bleibt am Leben
0,1 Mgr.	—	+ binnen 24 St.

Nukleoprotein	Pestheilserum von Manguinhos			
0,3 Mgr.	1 Kzm.	+ binnen 6 Tage		
«	0,75	+	« 13	«
«	0,5	+	« 11	«
«	0,25	+	« 12	«
«	0,1	+	« 6	«
—	0,5	bleibt am Leben		
0,1 Mgr.	—	+ binnen 48 St.		

Haette ich die Resultate nach 48 Stunden konstatiert, so waere keines der mit dem antibakteriellen Serum geimpften Tiere gestorben. Doch trat der Tod spaeter bei allen ein. Selbst bei den mit antiendotoxischem Serum behandelten Tieren fuehrt der spaetere Verlauf nicht selten zum Tode.

Wird die Menge des Nukleoproteins auf eine toetliche Minimaldosis erniedrigt, so wird das mit dem antibakteriellen Serum erzielte Resultat noch besser:

Nukleoprotein	Pestheilserum v Manguinhos	
0,1 Mgr.	1 Kzm.	Bleibt am Leben
«	0,75	«
«	0,5	+ binnen 48 St.

« «	0,25	vivo
« «	0,1	vivo
—	0,5	vivo
0,1	—	+ 48 h.

Em outro ensaio, em que numerosas passajens de bacilo da peste tinham aumentado a virulencia do germe, obtivemos o seguinte resultado:.

Nucl. Prot.	Soro de cavalo inoculado com nucleoproteina.	Ratos
0,05 mg.	1 cc.	+ 48 h.
« «	0,75	vivo
« «	0,5	vivo
« «	0,25	vivo
0,05 mg.	0,1	+ 48 h.
—	0,5	vivo
0,05	—	+ 48 h.

Mantendo fixa a quantidade de soro e variando a de nucleopreteina temos.

Soro de cavalo inoculado com nucleoproteina	Nucl. Prot.	Ratos
0,1 cc.	3 D. M. M.	vivo
« «	5 «	vivo
« «	7 «	+ 48 h.
« «	10 «	+ 24 h.
« «	12 «	+ 48 h.
« «	15 «	+ 24 h.
« «	20 «	+ 24 h.

Outro ensaio, aumentando proporcionalmente a quantidade de nucleoproteina e soro, mostrou-nos que a ação neutralisante não se exercia, segundo a lei das proporções multiplas.

Nucl. Prot.	Soro de cavalo inoculado com nucleoproteina	
1 mg.	1 cc.	+ 48 h.
« «	0,75	+ 48 h.
« «	0,5	+ 48 h.
« «	0,25	+ 24 h.
« «	0,1	+ 24 h.

Dos diversos ensaios, resulta que não conseguimos obter de cultura pura de bacilo da peste em meio liquido um produto toxico li-

«	0,25	Bleibt am Leben
«	0,1	Bleibt am Leben
—	0,5	Bleibt am Leben
0,1 Mgr.	—	+ binnen 48 St.

Bei einem anderen Versuche mit einem Stamme, dessen Virulenz durch zahlreiche Passagen erhoeht war, erhielt ich folgendes Resultat:

Nukleoprotein	Sertum des mit Nukleoprotein behandeltem Pferdes	
0,05 Mgr.	1 Kzm.	+ binnen 48 St.
«	0,75	Bleibt am Leben
«	0,5	«
«	0,25	«
«	0,1	+ binnen 48 St.
—	0,5	Bleibt am Leben
0,05 Mgr.	—	+ binnen 48 St.

Bei konstanter Serummenge und wechselnden Nukleoproteindosen erhielt ich:

Serum des mit Nukleoprotein bahandelten Pferdes	Nukleoprotein		
0,1 Kzm.	3	D. M. L.	Bleibt am Leben
«	5	«	«
«	7	«	+ binnen 48 St.
«	10	«	« 24 «
«	12	«	« 48
«	15	«	« 24 «
«	20	«	« 24 «

Ein anderer Versuch, bei welchem die Nukleoprotein und Serummengen proportionell erhoeht wurden, zeigte, dass die neutralisierende Wirkung nicht nach dem Gesetze der multiplen Proportionen erfolgt.

Nukleoprotein	Serum des mit Nukleoprotein bahandelten Pferdes	
1,0 Mgr.	1 Kzm.	+ binnen 48 St.
«	0,75	« «
«	0,5	« «
«	0,25	« 24 St.
«	0,1	« 24 St.

Aus den verschiedenen Versuchen geht hervor, dass es mir nicht gelang, aus Reinkulturen von Pestbazillen in Fluessigkeiten

vre de germes, capaz de imunisar animais ativamente, fornecendo estes um soro com ação neutralisante especifica Obtivemos de germes cultivados em meio solido, fazendo extração por meio de ajentes quimicos, um produto toxico, que, mortal para ratos não o era com a regularidade, que se exije para as toxinas e que, inoculado em cavalo produziu um soro exercendo ação neutralisante sobre o produto, porem não segundo a lei das proporções multiplas, faltando lhe por isto qualidade essencial para ser considerada verdadeira toxina.

Manguinhos, 3 de Abril de 1914.

ein keimfreies toxisches Produkt zu gewinnen, welches Tiere aktiv immunisiert, so dass diese ein Serum von spezifischer neutralisierender Wirkung liefern. Aus Kulturen auf festen Naehrboeden konnte ich mittelst chemischer Agentien ein toxisches Produkt gewinnen, welches Ratten toetete, aber nicht mit der Konstanz, die man von Toxinen erwartet, und, auf Pferde verimpft, ein Serum lieferte. welches auf das Produkt neutralisierend wirkte, indessen nicht nach dem Gesetz der multiplen Proportionen; es fehlt demselben also eine der noetigen Eigenhaschaften, um als wirkliches Toxin gelten zu koennen.

Manguinhos, den 3 ten April, 1914.

BIBLIOGRAFIA.

Litteratur.

KOLLE W. 1903 Studien ueber das Pestgift. Festschrift zu R. KOCH's 60 ten Geburtstag. – Jena.

KOLLE W, HETSCH H. und OTTO R. 1904 Weitere Untersuchungen ueber Pestimmunitaet. – Zeits. fuer Hyg. Bd. 48 pg. 368 – 456.

KOLLE W, und OTTO R. 1902 Vergleichende Wertpruefungen von Pestserum verschiedener Herkunft. – Zeit. fuer Hyg. Bd. 40 pg. 595 – 626.

KRAUS R. 1897 Ueber spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera, Typhus und Pestkulturen, erzeugt durch homologes Serum. – Wien. Klin. Woch.

LUSTIG, ALESSANDRO 1913 Ueber Bakteriennukleoproteide.-Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Zweiter Bd. Zweiter Haelfte, pg. 1362.

LUSTIG A. UND GALLOTI G. 1897 Versuche mit Pestschutzimpfungen bei Tieren. Deut. Med. Woch. pg. 227 – 230.

MAC CONKEY A, T. 1912 The preparation of antitoxic plague sera. – The Journ. of Hyg., Plaguesupplement II: Seventh report on plague investigation in India.

MARKL, G. 1898 Beitrag zur Kentniss der Pesttoxine. – Centr. fuer Bakt. Bd. 24. N. 18 e 19, pg. 641 – 649.

MARKL, G. Ueber die Pesttoxine und die Gewinnung von antitoxischem Pestserum.—Muench. Med. Woch.

MARKL, G. 1901 Weitere Untersuchungen uber die Pesttoxine. – Zeit. fuer Hyg. N. 37, pg. 401 – 438.

PICK, E. P. 1908 Darstellung der Antigene mit chemischen und physikalischen Methoden.-Handbuch der Technik und Methodik der Immunitätsforschung. Erst. Bd. pg. 353.

ROWLAND SYDNEY 1911 Preliminary observation on the protective and curative value for the rats of the serum of a horse immunised with a toxic nucleoprotein extracted from the plague bacillus.—The Journ. of Hyg., Plague suppl. I: Sixth report on plague investigation in India, pg. 11 – 19.

ROWLAND SYDNEY 1911 Second report on investigations into plague vaccines. The Journ. of Hyg., Plague Suppl. I: Sixth report on plague investigations in India, pg. 20 – 46.

ROWLAND SYDNEY 1912 The onset and duration of the immunity consequent on the inoculation of the plague nucleoprotein. Reports on plague investigations in India. The Journal of Hygiene, Vol. XII, pg. 367 – 372.

ROWLAND SYDNEY 1910 Experiments on the vaccination of animals against plague. First report on investigations into plague vaccines. Extra plague number. The Journal of Hygiene Vol. X.